中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 33(1)：053～058 (1984)

細花野牽牛簇葉病之光學及電子顯微鏡觀察[1]

楊一郎[2]　陳脉紀　曾德賜[3]

摘要：細花野牽牛簇葉病病株及感染該病之長春草病株之葉脈組織經超薄切片與電子顯微鏡觀察結果，在其病組織之篩管細胞內發現多形性擬菌質體 (Mycoplasma-like organism) 之存在，擬菌質體直徑約為 60～740 nm，在長春草病組織篩管細胞內較為充滿擬菌質體。另以該長春草病組織徒手切片之 Dienes' stain 染色與光學顯微鏡觀察結果，在其篩管細胞內顯現專一性藍色反應，此項反應表示該篩管細胞中擬菌質體之存在。另在供試健全植株者則無此項反應亦無擬菌質體之存在。依此項擬菌質體之形態存在位置及對 Dienes' stain 之特殊反應與其他已知簇葉病所發現之擬菌質體相類似，該擬菌質體可能為新記載之細花野牽牛簇葉病之病原。

細花野牽牛簇葉病 (*Ipomoea obscura* witches' broom) 係第一作者於 1977 年在臺南發現之新病害 [2,5,7]。本病在國外尚無報告，乃依其花器葉化 (phyllody) 及細葉叢生病徵稱為細花野牽牛簇葉病，本病普遍發生於本省中南部，為一種簇葉萎黃型病害 [7]。本病經證實可經菟絲 (*Cuscuta chinensis* Lam.) 媒介 (Cuscuta vector) 傳染而使長春草 (*Vinca rosea* L.) 罹病並顯現葉化花 (phyllody) 及極端之小葉叢生及黃化枯死之嚴重型叢生萎黃病徵 (Extremely bushy witches' broom symptoms) [5,7]。本病與本省田間發現之甘藷簇葉病 (Sweet potato witches' broom)、落花生簇葉病 (Peanut witches' broom)、絲瓜簇葉病 (Loofah witches' broom) 及國外報告之 (Aster yellows) 等叢生型萎黃病相異，為一種在國外尚無記錄之新植物菌質病害 [1,2,3,4,5,6,14,16,17]。本文將本病病原之電子顯微鏡與光學顯微鏡觀察結果提出報告，以供植物叢生型萎黃病害研究之參考。

材料與方法

一、電子顯微鏡觀察 (Electron microscopic observations)：以細花野牽牛簇葉病病株及感染該病之長春草典型病株葉片，沿葉脈切成 5×1 mm 大小之小片，在低溫 4°C 下固定於以0.1M磷酸緩衝液 (pH 7.0) 稀釋之4 %戊二醛 (Glutaraldehyde) 及四氧化鋨 (Osmium tetroxide) 各 2 小時，以酒精系列 (Alcohol series) 脫水後包埋於 (Epon 812) 樹脂混合液內 [15]。超薄切片以 Leitz's Fernāndez-Morān type 超薄切片機進行，並以醋酸鈾 (Uranyl acetate) 及酒石酸鉛 (Lead tartrate) 染色，最後以 JEM-7 型電子顯微鏡，於 80 KV下觀察之 [9,11]。健全葉片亦以同一方法進行包埋及觀察，藉以做為對照。

二、光學顯微鏡觀察 (Light microscopic observations)：依 Deeley *et al.* 等之方法 [6,8,12]，以

1.臺灣省農業試驗所　研究報告第 1145 號。本文為行政院國科會補助計畫 (NSC-71-0409-B055-02) 之部分報告。

2.本所植物病理系副研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

3.國立中興大學植病系教授及助教。

菟絲媒介感染細花野牽牛簇葉病之典型叢生長春草病株分蘖葉脈及莖組織之徒手切片，經 0.2 % Dienes' stain 染色，另以健全長春草植株組織切片對照，經以光學顯微鏡觀察判別其病組織篩管細胞之 MLO 存在情形，並以此方法比較及證實其電子顯微鏡觀察之結果。

結 果

一、電子顯微鏡觀察：

在細花野牽牛簇葉病病株葉脈之超薄切片，發現在篩管細胞內有多變型擬菌質體 (Pleomorphic mycoplasma-like bodies) 存在，在薄壁組織或葉肉組織細胞中則未發現。健株葉脈切片亦無擬菌質體的存在。擬菌質體在篩管細胞之分佈情形不一致，菌體零散分佈，其大小型狀亦頗不一致，有小球型、圓型、橢圓形及曲管形等，菌體數量較爲稀少而不充滿（圖 1.2）。在長春草病株葉脈切片之篩管細胞內，即有充滿之多形性擬菌質體，菌體在該細胞內極多量聚集充滿而呈大圓型、橢圓型及小球型等，在中型及大型菌體內可觀察到網狀絲 (Net-like strands)（圖 3）。上述菌體大小頗不一致，其直徑約爲 60—740 nm，在長春草病株組織之篩管細胞之菌體分佈較多且濃度較高。此項結果與其他已報告之植物萎黃病所發現之擬菌質體（Mycoplasma-like organisms）(MLO) 相類似[9,10,11,13,14,16,17]。

二、光學顯微鏡觀察：

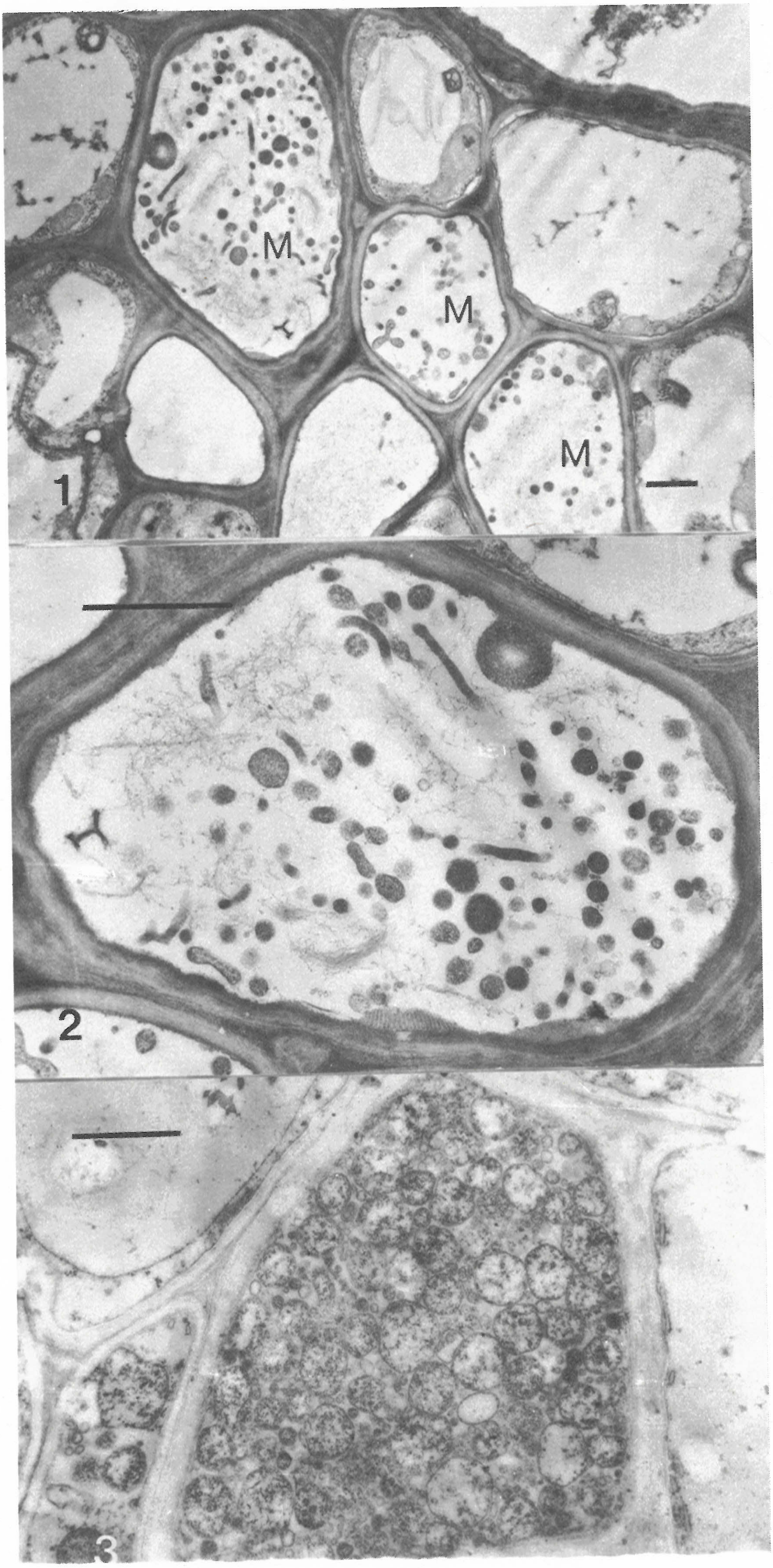
感染細花野牽牛簇葉病之長春草叢生病株及其對照長春草健株(圖 6)組織切片之染色與光學顯微鏡觀察結果，在病組織篩管細胞內看到極顯著之專一性藍色反應(Specific blue staining reaction)（圖 4），在對照健全材料則無此項反應（圖 5）。各病組織篩管細胞內之藍色反應之形狀及濃度與分佈情形頗不一致，此項專一性藍色反應表示其 MLO 之存在及分佈情形，此項結果與電子顯微鏡觀察結果相符且與 Deeley *et al.* 與楊等之報告相符[6,8,12]，並證實 Dienes' stain 對 MLO 之專一性藍色反應[12]。

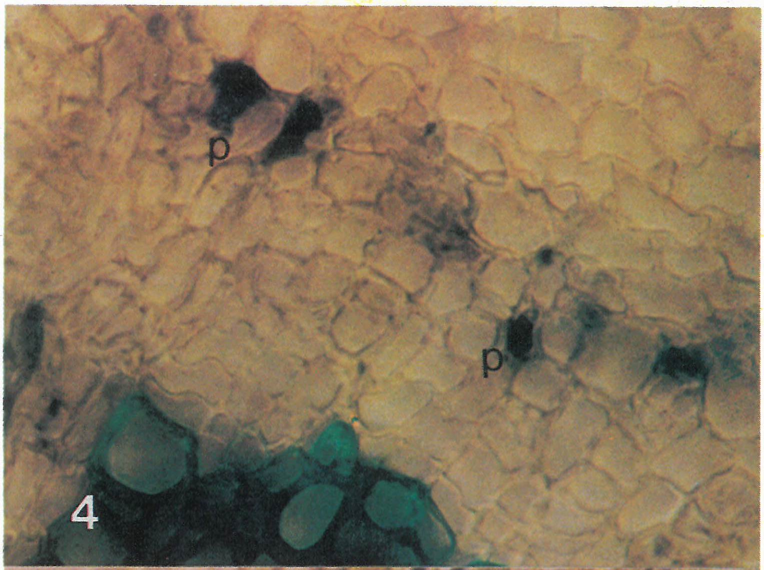
討 論

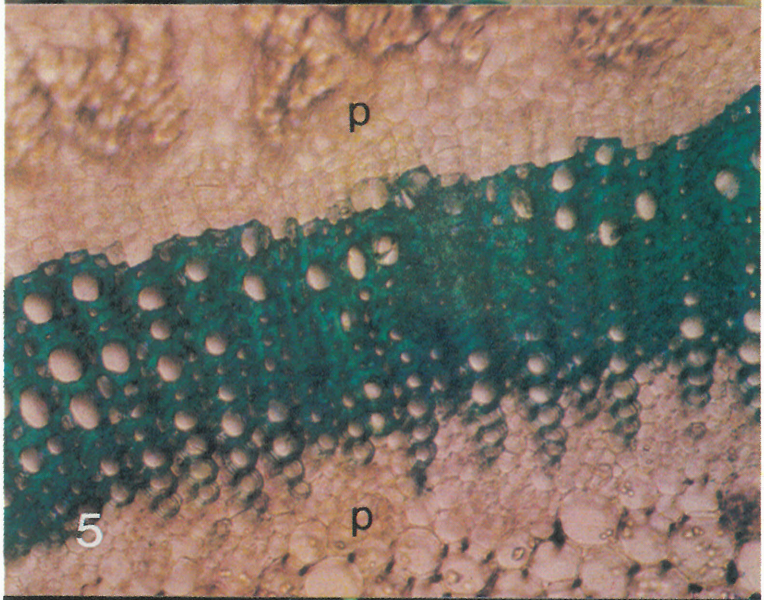
細花野牽牛簇葉病係第一作者在本省發現之新萎黃病[1,3,5,7,11]。本病在長春草上形成之極多數細葉與細分蘖叢生萎黃及早期枯死病徵顯然與甘藷、落花生、絲瓜等簇葉病迥異[4,8]，亦與泡桐及 Aster yellows 等已報告之簇葉病在長春草上之病徵不同[3,7,16,17]。本報告在病組織篩管細胞觀察到之多形性擬菌質體病原與土居等各項已報告之植物萎黃型病所發現之擬菌質體病原相近似[2,9,10,11,13,14,16,17]。本報告以本病之長春草病株組織之電子顯微鏡及光學顯微鏡觀察結果證實其病原菌質體之存在及其濃度與分佈位置並證實長春草爲其病原菌體之良好且感受性高之寄主植物，本病易使長春草罹病枝枯且使全株枯死[7]。本病與本省田間發生之白花牽牛 (*Ipomoea sinensis* Choisy)、馬鞍藤 (*Ipomoea pes-caprae* Sweet)、山土豆 (*Alysicarpus nummularifolius* DC.) 等之簇葉病不同（未發表）。本病與其他作物之關係尙待探討。

誌 謝

本研究承行政院國科會資助 (NSC-71-0409-B055-02)，日本北海道大學四方英四郎教授，臺大蘇鴻基教授與農發會邱人璋博士之鼓勵與指導，本所林益昇主任之支持與吳淑雅小姐之協助，謹致謝忱。


M
M
M
1
2
3


p
p
4


p
p
5

A
B
6

圖片說明：

圖1.細花野牽牛簇葉病病葉韌皮部之超薄切片，在各篩管細胞內均可觀察到擬菌質體（M）。

Fig. 1. An ultrathin section of phloem of *Ipomoea obscura* leaf infected with witches' broom. Mycoplasma-like organisms (M) are seen in sieve cells.

圖2.細花野牽牛簇葉病病葉篩管細胞內（圖一之部份放大）存有橢圓形及曲管形等多形性菌體。

Fig. 2. Large magnificatoin of a part of Fig. 1. Illustrating spherical and filamentous forms of pleomorphic bodies in a sieve cell.

圖3.長春草病組織之篩管細胞內，聚集充滿許多大小不同之擬菌質體，菌體內可看到核糖體及網狀絲。

Fig. 3. Numerous mycoplasma-like organisms varied in size, are accumulated in a sieve tube cell of infected periwinkle leaf tissue. Ribosomes and net-like strands are seen in the bodies. (all the bars in the figures indicate 1 μm)

圖4.長春草病株莖部組織切片之 Dienes' stain 染色，在其篩管細胞內（P）存有細花野牽牛簇葉病菌質體呈顯明之藍色反應。

Fig. 4. Transverse section of infected periwinkle stem treated with Dienes' stain, in whitch the phloem tissue (p) containing *Ipomoea obscura* witches' broom mycoplasmas stains distinctly blue.

圖5.長春草健株莖部組織切片之 Dienes' stain 染色，其篩管細胞內（P）並無藍色之染色反應。

Fig. 5. Transverse section of healthy periwinkle stem treated with Dienes' stain, none of the phloem (p) stains blue coloration.

圖6.感染細花野牽牛簇葉病之長春草病株（A）與其健株（B）。

Fig. 6. Periwinkle infected with *Ipomoea obscura* witches' broom (A), and healthy (B).

參考文獻

1. 四方英四郎・1972・海外に發生するマイコプラズマ樣微生物による植物の病害・植物防疫，26：184～189。
2. 陳脉紀、曾德賜、楊一郎・1979・細花野牽牛簇葉病之電子顯微鏡觀察・植物保護學會會刊・68年年會論文摘要。
3. 楊一郎・1878・甘藷等三種植物簇葉病之兎絲媒介傳染研究・植物保護學會會刊・67年年會論文摘要。
4. 楊一郎・1979・甘藷簇葉病之兎絲媒介傳染・中華農業研究，28：23—28。
5. 楊一郎・1979・細花野牽牛簇葉病之研究・植物保護學會會刊・68年年會論文摘要。
6. 楊一郎・1982・臺灣數種植物萎黃病的光學顯微鏡觀察・科學發展月刊，10（1）：57—62。
7. 楊一郎・1982・細花野牽牛簇葉病之兎絲媒介傳染・中華農業研究，31（3）：235—238。
8. 楊一郎・1983・落花生簇葉病之兎絲媒介傳染與顯微鏡觀察・國科會科學發展月刊，11（9）：821—826。
9. 楊一郎、陳脉紀・1978・臺灣蕃茄簇葉病之研究（I）嫁接傳染與電子顯微鏡觀察・植物保護學會會刊，20（4）：360—365。
10. 楊一郎、蘇鴻基、呂淑卿・1973・臺灣芝麻簇葉病之研究（II）似菌質體病原・植物保護學會會刊，15（1）：1—4。
11. Chen, M. J. 1979. Electron-microscopic observations of several plant-infecting mycoplasma-like organisms in Taiwan. Plant Protect. Bull. (Taiwan), 21 : 25-36.
12. Deeley, J., W. A. Stevens, and R. T. V. Fox. 1979. Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. Phytopathology, 69 : 1169-1171.
13. Doi, Y., and H. Asuyama. 1981. Paulownia witches' broom disease. In "Mycoplasma diseases of trees and shrubs" pp. 135-145. (Tokyo University, Academic Press Inc.)

14. Doi, Y., M, Teranaka, K. Yora and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma or PLT group-like micro-organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 33 : 259-266.

15. Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods, J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 : 409-414.

16. Maramorosch, K., R. R. Gronados and H. Hirumi. 1970. Mycoplasma diseases of plants and insects. Adva. Virus Res. 16 : 135-139.

17. Miyahara, K., M. M. Tszaki, K. Tanaka and N. Sako. 1982. A New Disease of onion caused by Mycoplasma-like organism in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 48 : 551-554.

Light and Electron Microscopic observation of *Ipomoea obscura* witches' broom disease[1]

I. L. Yang[2], M. J. Chen and D. S. Tzen[3]

Summary

Electron microscopic examinations made on thin-sections of diseased leaves from *Ipomoea obscura* Ker. and periwinkle infected with *Ipomoea obscura* witches' broom revealed the presence of pleomorphic bodies of Mycoplasma-like organisms (MLO) in the sieve cells of phloem tissues.

These MLOs were found in various sizes and concentrations, and the size ranged from 60 to 740nm in diameter, and more aggregation or high concentrations in periwinkle diseased phloem tissues.

Light microscopic observation made on hand-sections of diseased leaves of periwinkle showed distinctly specific blue staining reaction with Dienes' stain in sieve cells, which indicated the presence of MLOs in the phloem tissues, and gave no reaction in phloem tissues and none of MLO was found from those sections of healthy plants. Since the morphology and localization and the specific reaction with Dienes' stain of these MLOs were similar to those found previously elsewhere in witches' broom diseases, these pleomorphic bodies seemed to be the causal organism of the new recorded *Ipomoea obscura* witches' broom disease.

---

1. Contribution No. 1145 from Taiwan Agricultural Research Institude. This study was supported by Grant No. NSC-71-0409-B055-02, the National Science Council, ROC.

2. Plant Pathologist, Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, Taichung Hsien , Taiwan 431, ROC.

3. Professor and Assistant, respectively, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University.